

## · 综述 ·

## 微小 RNA 技术与病毒性肝炎研究

李晓光 成军 洪源

病毒性肝炎严重危害人民的健康,尤其乙型和丙型病毒性肝炎,相当比例感染者可发生慢性化,严重可发展为肝硬化、肝癌。免疫损伤是慢性乙型和丙型病毒性肝炎的主要发病机制,但具体机制尚不十分清楚,至今尚未完全阐明。由于微小 RNA (microRNA) 是普遍存在的转录后调节微小 RNA,又由于慢性乙型和丙型肝炎病毒感染后在细胞内长期存在,这就为机体和病毒本身产生 microRNAs 提供有力条件,这样宿主与病毒 microRNAs,病毒与宿主 microRNAs 之间必然会存在相互的联系,推测对病毒性肝炎的慢性化,肝癌的发生等都会起到一定的作用。

微小 RNA 是指长度为 18 ~ 24 个核苷酸 (nt) 左右的一组无编码功能的核苷酸家族。过去被认为在生物学方面没有很大的作用,最近发现 microRNAs 在动物和植物基因组的转录及生物学活动中具有重要的调节功能。人体内已鉴定出了 300 多个微小 RNA,许多微小 RNA 具有独特的组织特异性,如人的不同组织有其特异性的微小 RNA 表达,从而形成一定的组织特性。发现有些病毒也能编码微小 RNA,主要集中于疱疹病毒家族。病毒感染宿主后,与宿主之间及二者产生的微小 RNA 相互作用,对病毒致病方面应具有重要的作用。本文就 microRNAs 的发现、发生、发现手段,病毒和宿主间通过 microRNAs 的相互作用以及 microRNAs 在病毒性肝炎研究中的重要性进行综述。

## 一、微小 RNA 的发现

1993 年在对秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 的基因筛查研究中,发现了第一个微小 RNA 即 lin-4 及其作用的靶基因 lin-14,这个 22 nt 长度的 lin-4 通过非精确配对结合到 lin-14 的 3' -非翻译区的互补区对靶基因的转录进行负调节<sup>[1,2]</sup>。当时多数人认为这只是蠕虫独特的一种调控方式,并没给予更多的关注。直到 2000 年 Ruvkun 等发现了线虫另一个的调节因子 let-7<sup>[3]</sup>才受到重视。let-7 也编码一个小的非编码 RNA,令人惊讶的是 let-7 从蠕虫到哺乳动物无论是序列还是表达模式都是相当保守的。至此微小 RNA 才得到高度的重视和广泛的研究。但目前对微小 RNA 的研究也是相对的初步阶段。

## 二、微小 RNA 的形成过程和功能

miRNA 由 RNA 多聚酶 II 作用下从基因组转录而来,原始转录体称为 pri-miRNA, pri-miRNA 经过加帽和多聚腺苷酸化及典型的顺式 (cis) 裂解等处理, pri-miRNA 可以是几千个碱基对长。miRNA 可以位于外显子也可以位于内含子区,大约 25% 的 miRNA 位于能够编码蛋白基因的外显子当中<sup>[4]</sup>。一个 pri-miRNA 可

作者单位:100011 北京地坛医院传染病研究所

通讯作者:成军 Email: cj@genetherapy.com.cn

以包含一个 miRNA,也可以包含几个 miRNA。在 pri-miRNA 内部含有大约 60 ~ 80 nt 的序列能够通过非精确配对形成茎-环结构。成熟的 miRNA 一般来自于 pri-miRNA, pri-miRNA 开始被核内的微处理器复合体识别,微处理器复合体的核心成分是 RNase-III 酶 Drosha 和 Drosha 的伙伴 DGCR8/Pasha,微处理器复合体能够剪切掉茎-环发卡结构,这个含有 60 ~ 80 nt 的茎-环发卡结构被称为 pre-miRNA。pre-miRNA 内含有有活性的成熟的 miRNA 成分<sup>[5-8]</sup>。pre-miRNA 被核内的核输出因子输出素-5 (exportin-5) 识别并输出到细胞浆内<sup>[9-11]</sup>。在细胞浆内,另一个 RNase-III 酶 Dicer 对 pre-miRNA 进行裂解切除环状部分后形成大约 18 ~ 24 nt 长度的双链 RNA 分子,即 miRNA<sup>[12-16]</sup>。双链 miRNA 的其中一股被称为前导链掺入 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)<sup>[17]</sup>,接着 miRNA 指导 RISC 复合体到靶 mRNA 部位,随后引起靶 mRNA 的裂解或蛋白翻译的抑制,这取决于 miRNA 与靶 mRNA 的互补程度,发现精确互补或接近精确互补导致 mRNA 的裂解,部分互补导致蛋白翻译的抑制<sup>[18-20]</sup>。

### 三、研究 miRNA 的技术

1. 正向遗传学方法鉴定 miRNA:正向遗传学方法对于首先发现的 miRNA 如 lin-4 和 let-7 起到了很大的作用。在分析缺陷的线虫细胞系普的表型时发现,小非编码的 RNA 即 lin-4 的突变对于表型变化有影响<sup>[1]</sup>。lin-4 有 2 种形式,大的是 60 nt 左右的 RNA,能够折叠成茎环结构,小的是 22 nt 的 RNA,是茎环结构的茎部,并能够通过和 lin-14 的 3'-非翻译区非精确配对结合而抑制 lin-14 的表达<sup>[2]</sup>。后来又用此法发现了 let-7<sup>[3]</sup>,它的发现对 miRNA 的发现起到了巨大的推动作用,因为 let-7 在不同的物种之间具有很好的保守性<sup>[21-22]</sup>,表明 miRNA 介导的基因调节作用远比以前所想的要更古老和广泛。此后用正向遗传学方法又发现了 4 个 miRNA,如果蝇种属的 bantam、miR-14 和 miR-278<sup>[23-25]</sup>以及线虫的 lsy-6<sup>[26]</sup>。

正向遗传学方法对于 miRNA 的发现起到的重要的作用,尽管将来还可能会应用正向遗传学方法发现一些 miRNA,但由于此方法有其自身的局限性,不会是将来发现 miRNA 的主要方法。正向遗传学方法的局限性:由于 miRNA 很小而且 miRNA 对突变的耐受能力强,很难影响或改变所谓的“种子序列”(seed sequence),这样对于自发的或诱导的基因突变的基因打靶很难。由于绘制的基因突变图谱主要都集中于蛋白的编码区,即使一个 miRNA 被敲除,研究者仍可能发现不了其表型的变化。况且表型的筛查的工作量太大,许多的突变的 miRNA 也不可能都被发现。

2. 从小 RNA 文库鉴定 miRNA:目前比较好的方法从头鉴定 miRNA 是对构建的与 miRNA 片段大小相应的 cDNA 文库进行测序。构建 cDNA 文库开始的目的是克隆 22 nt 左右的小干扰 RNA 分子<sup>[27]</sup>,后来发现此文库中有许多内源的 miRNA 分子。目前已发展了一些鉴定小 RNA 的方案,这些方案都已成功的应用于鉴定当前已知的大多数 miRNA。所有的方案除了一些细节方面的不同外大致都遵循相同的规则<sup>[28]</sup>。首先用变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 RNA 样本,回收片

段大小在 20 ~ 25 nt 左右的 RNA 片段,然后分别给 RNA 片段连上 3'-和 5'-接头,进行 RT-PCR,产物克隆到载体上构建 cDNA 文库,对克隆测序并分析小 RNA 的基因组来源。通过克隆方法鉴定表达水平低,非常特殊阶段和稀有细胞系的 miRNA 很难。原则上来说这个困难可通过深度测序的方法来克服。此外更难解决的问题是有些 miRNA 由于本身的一些特性如序列组成,转录后修饰如编辑或甲基化等很难克隆<sup>[29-31]</sup>。一旦小 RNA 从 cDNA 文库克隆出来,就须对其进行生物信息学分析鉴定基因组来源;鉴定包括小 RNA 的核苷酸序列在基因组定位,是否相应的基因组区能够编码发夹结构前体以及是否这个发夹结构在别的物种也是保守的,这些多是非常琐碎的工作。然而发夹结构在真核细胞基因组是常见的,而且不是 miRNA 特有的特征,所以使得这个分析工作变得十分复杂的。这就需要把 miRNA 和其他内源的小 RNA, mRNA 或结构 RNA 的降解产物进行区分。不幸的是当前还没有唾手可得的用于处理从小 RNA 文库获得的测序结果的软件。

3. miRNA 的计算机预测:近年 miRNA 的研究受到了广泛的关注,许多计算机预测的方法相应而生。主要是根据 miRNA 特殊的结构特征进行预测。首先,所有的预测方法都是运用二级结构特征,因为折叠结构是 miRNA 的重要特征;其次是依靠序列和结构的保守性从相关基因组的发夹结构区分 miRNA 候选基因;最后需要对发夹结构的热动力学的稳定性进行评价,或者使用已知 miRNA 基因组的定位信息进行相关预测。

miRNA 预测首先主要是依靠序列保守性的原则,主要的常用软件有 MirScan、snarloop、miRSeeker 等。MirScan 软件通过比较预测基因和已知 miRNA 的相似性来鉴定保守的发夹结构并依据相似程度对其进行排序,已鉴定出了 35 个新的线虫 miRNA 候选基因<sup>[32]</sup>和 107 个人 miRNA 候选基因<sup>[33]</sup>。随后在线虫的预测过程中又联合了运算法则(发夹结构的特征上游序列具有保守性特征)使得预测更加完美<sup>[34]</sup>;snarloop 软件曾经在线虫的 miRNA 预测中发挥很大作用<sup>[35]</sup>,已经预测了 214 miRNA 个候选基因,估计可产生 140 ~ 300 或更多个 miRNA;使用 miRSeeker 软件在 *D. melanogaster* 中预测了 48 个 miRNA 候选基因<sup>[36]</sup>,这个软件不仅运用了保守性的原则,而且还能识别 miRNA 特异的保守模式(如差别更大的环状结构,更加保守的发夹结构的茎部等)。

除了 miRNA 本身的保守性预测外,根据 miRNA 作用的靶序列的保守性进行 miRNA 的预测是另一种有意义的方法。Xie 等<sup>[37]</sup>发现在基因组的 3'-非翻译区广泛存在着保守序列,而且很多保守序列与已知的 miRNA 的种子序列是吻合的。miRNA 的种子序列由成熟的 miRNA 的从第一个或第二个核苷酸开始的 7 到 8 nt 组成,这个序列对于 miRNA 和靶序列的相互作用是非常重要的<sup>[38-44]</sup>。通过分析靶序列区与已知的 miRNA 不配对的序列,Xie 等预测了 129 个新的人 miRNA 候选基因。这个方法近来应用于 *A. thalilana*、蝇和蠕虫的 miRNA 预测<sup>[45,46]</sup>。此外,二级结构的热动力学的稳定性是区分 miRNA 和其他发夹结构的另一个重要



特征<sup>[47]</sup>。Bonnet 等发现与 tRNAs 和 rRNAs 相比,miRNA 的折叠自由能比前二者都明显低。RNAz 软件联合热力学稳定性和二级结构的保守性特征用于预测 RNAs<sup>[48,49]</sup>,已经在各种微生物中成功的预测了 miRNA<sup>[50,51]</sup>。

然而,依靠不同种系的 miRNA 结构和序列的保守性进行预测的方法对非保守基因编码的 miRNAs 不能进行预测。为了征服这个难关,一些研究小组研究出了从头预测 miRNA 的方法<sup>[52-54]</sup>,这个方法仅仅运用了 miRNA 固有的结构特征对 miRNA 进行预测。这些方法有自己的标准,根据这些标准(如折叠的自由能,最适的茎部的长度,对称环状结构的平均尺寸,茎部不同核苷酸的比例等)就能够评价候选基因与已知的 miRNA 的相似程度,一旦一系列特征被限定了就可以制作一个模型用于评估被鉴定的 miRNA,应用从头预测 miRNA 的方法在病毒<sup>[55]</sup>和人<sup>[52]</sup>已经发现许多非保守的 miRNAs,并经实验验证。

另一个有效发现 miRNA 的方法是针对已知 miRNA 的序列周围的基因组序列进行分析,许多 miRNAs 是成簇或相邻分布的<sup>[56]</sup>。多种人和鼠 miRNAs 就是通过这种方法发现的<sup>[57,58]</sup>。

4. 候选 miRNA 的实验验证:通过计算机预测的 miRNA 候选基因需要实验的验证。原则上如果实验证实有 22 nt 左右的成熟的 miRNA 表达就表明这个 miRNA 是有效的。miRNA 的验证方法有两类,一是检测成熟 miRNA 的精确末端,另一是鉴定成熟 miRNA 的表达情况。miRNA 预测算法通常不能预测成熟的 miRNA 在 pri-miRNA 中的精确位置。鉴定成熟 miRNA 的末端尤其是 5'-末端对于后续的 miRNA 靶基因序列的预测是非常重要的。所以小 RNAs 的克隆和测序就显得尤为重要,联合随机克隆小 RNA 文库和 miRNA 预测是可行的办法。在 PCR 为基础的直接克隆方法中,一个引物是针对 5'-接头的通用引物,另一引物是 miRNA 3'-区的重叠序列,这样能增加从小 RNA 文库扩增特异性 cDNA 克隆的效率<sup>[32,33]</sup>。这种方法只有 miRNA 的 5'-端的序列能被检测;另一种方法是在克隆前用生物素对预测的 miRNA 的寡核苷酸进行标记,这个方法的好处是能够推断成熟 miRNA 的全部序列。

各种杂交技术也可以用于检测预测的 miRNA 的表达。Northern blot 能够用于检测预测的 miRNA 的表达和大小,也常用于验证克隆的 miRNA 的表达情况。Northern blot 的缺点是对稀有的 miRNA 的检测不敏感。

另一个以杂交为基础的鉴定 miRNA 的方法是引物延伸法。这个方法的引物仅比预测的 miRNA 短几个核苷酸,与 RNA 样本杂交,以 RNA 为模板在逆转录酶作用下延伸。这个方法只能鉴定 miRNA 的 5'-末端<sup>[59]</sup>。而 RAKE(RNA-primed array-based Klenow extension)分析法<sup>[60]</sup>能够检测 miRNA 的 3'-末端,这个方法是通过 miRNA 与微点阵的探针进行杂交进行分析的,RAKE 分析最早是为检测已知的 miRNA 而设计的,但也适用于检测高通量的预测的 miRNA 的 3'-末端。尽管传统的 miRNA 微点阵技术也能用于检测预测的 miRNA,但是 RAKE 不仅能行使传统 miRNA 微点阵的功能还能检测预测 miRNA 的 3'-末端。近来还发展了原

位杂交的技术检测 miRNA<sup>[61-63]</sup>,而且能够用于检测候选 miRNA 的时空表达模式,但是原位杂交方法不能提 RNAs 片段的大小和末端的信息。

#### 四、病毒基因编码的 miRNA

随着对 miRNA 研究的深入,一些学者发现有些病毒也能够编码 miRNA,尽管功能还不很清楚,但是可以推测病毒本身编码的 miRNA 对于病毒在宿主细胞内的复制生存应是有益的。尽管病毒 miRNA 对于病毒在宿主细胞内的生存复制是有利的,但是目前的研究对于病毒 miRNA 的形成过程仍不是很清晰。miRNA 形成的起始步骤必须在核内完成,因为 Drosha 在核内裂解 pri-miRNA<sup>[64-66]</sup>;大多数 RNA 病毒和一部份 DNA 病毒在细胞浆内复制和表达病毒基因组,而 Drosha 裂解 pri-miRNA 后形成的 3 个成分,只有 pre-miRNA 能够输出进入细胞浆<sup>[67]</sup>,因此如果 RNA 病毒进入核内编码 mRNA, RNA 病毒基因组就可能因被裂解而遭毁坏。基于这些考虑, RNA 病毒、痘病毒和细胞浆内 DNA 病毒有可能不编码 miRNA,但事实上已发现人免疫缺陷病毒(HIV)能够编码 miRNA,所以这种推断也不是绝对的。

目前已发现的能够编码 miRNA 的病毒主要是疱疹病毒家族。目前以 EB 病毒编码的 miRNAs 为最多,32 个不同的 miRNAs<sup>[55]</sup>;卡波氏肉瘤相关的疱疹病毒(KSHV)目前已发现编码 17 种不同的 miRNAs<sup>[68]</sup>,鼠  $\gamma$ -疱疹病毒编码 10 种 miRNAs,人巨细胞病毒编码 14 种 miRNAs<sup>[55]</sup>,单纯疱疹病毒 1 型编码 1 种 miRNA<sup>[69]</sup>,恒河猴淋巴隐病毒(rLCV)编码 22 种 miRNAs<sup>[70]</sup>。此外,人腺病毒(hAV)目前发现编码一种 miRNA<sup>[71-73]</sup>;多瘤病毒家族的 SV40 目前发现编码 2 种 miRNAs<sup>[74]</sup>,HIV 目前发现编码 1 种 miRNA<sup>[75]</sup>。随着研究的深入还将会有越来越多的病毒 miRNAs 不断被发现。

疱疹病毒家族不同成员间的 miRNA 既缺乏保守性又存在一定的相似性。缺乏保守性是由于经过千万年的进化造成的;而有 1300 多万年进化距离的 EB 病毒和恒河猴淋巴隐病毒间有多个相似的 miRNAs<sup>[70]</sup>,这些相似性又表明了这些 miRNAs 对于自然选择应是有利的。且人类巨细胞病毒编码的 miRNA 与黑猩猩编码的 miRNA 似乎也是保守的。腺病毒编码的约 160 nt 的非编码 RNA,即 VA1。VA1 的表达水平很高,在其裂解复制的后期阶段其可达  $10^8$  拷贝/细胞<sup>[76]</sup>。RNA VA1 由核内的 RNA 多聚酶 III 转录而来,接着被核内的 Exp5 输出细胞浆<sup>[76-78]</sup>。由于 VA1 的 Exp5 和 Dicer-TRBP 的识别位点相同<sup>[79-80]</sup>,所以被 Dicer 酶处理的机会很小,仅有 1% 的 VA1 被处理成 miRNA<sup>[72]</sup>。而且有证据表明 VA1 是 Dicer 酶的抑制剂<sup>[71,72]</sup>。即使只有 1% 的 VA1 被处理成 miRNA,每个腺病毒感染的细胞仍可产生  $10^6$  拷贝 miRNA,这个数量仍是很高的,可能高于几乎所有内源的 miRNA,因此,VA1 产生的 miRNA 仍可能在腺病毒的生活周期中有一定的作用,还有待进一步验证。

#### 五、病毒和宿主通过 miRNAs 的相互作用

所有多细胞动物的细胞都编码 miRNAs,每个细胞含有 miRNAs 大约 1000 拷

贝以上<sup>[81]</sup>,而且每个细胞有多重的 miRNAs 表达,不同组织 miRNAs 的表达模式也不同。研究表明 mRNA 不存在于含有能和其序列互补的 miRNA 存在的细胞内,以免被降解或蛋白表达受抑制<sup>[43-44]</sup>。所有脊椎动物病毒能被 RNA 干扰抑制,可推断病毒 mRNA 也可能被宿主细胞的 miRNA 抑制。如果是这样,病毒就选择特殊的组织进行复制表达,例如 HIV 就选择 CD4 阳性淋巴细胞复制。因此病毒通常选择含有很少或不含有与病毒本身 mRNA 互补的 miRNA 的组织生存,这样病毒就不能被其所在的靶组织的 miRNAs 抑制,否则感染非正常的靶细胞就会被相应的 miRNAs 抑制。如果这个假设正确的话那么动物病毒在决定组织嗜性方面有重要作用。如逆转录病毒 PFV (primate foamy virus) 在人类胚胎肾 293T 细胞系的复制能被人 miR-32 抑制,miR-32 在所有脊椎动物是高度保守的,但 PFV 仅能感染黑猩猩,由此有人认为 PFV 能被胚胎肾 293T 细胞 miR-32 抑制可能是偶然的现象,也可能是由于 PFV 在体内主要位于唾液腺内复制,唾液腺内无 miR-32<sup>[82]</sup>。

Bennasser 等<sup>[83]</sup>用计算机预测了 HIV 编码的 miRNAs,并预测了相应的靶位点,发现 5 个 pre-miRNAs 能够编码 10 个 miRNAs,这 10 个 miRNAs 能够调节约 1000 个宿主的转录体。Couturier 等<sup>[84]</sup>在计算机筛查 HIV 编码的 miRNAs 作用的靶位点时发现 HIV 前病毒基因组与细胞内重要的蛋白和细胞因子有多重的互补配对,如 CD28、CD40L、IL-2、IL-3、TNF- $\beta$ 、IL-12、CD4 等,这些因子在 HIV 的发病机制中占有重要作用。当前认为多重的不完全的互补配对可导致蛋白的翻译抑制,而且发现 HIV 前病毒基因组与人类蛋白编码基因存在互补性,加之 HIV 感染后许多细胞基因包括 CD28 出现下调。近来,Cui 等<sup>[69]</sup>发现单纯疱疹病毒能编码 miRNAs,随后 Gupta 等<sup>[85]</sup>发现 HSV-1 LAT 编码的一个 miRNA 作用于细胞凋亡途径,保护细胞免受凋亡。这些都表明了病毒和宿主在 miRNAs 水平存在着相互作用。

EB 病毒不仅能够引起潜伏性感染,而且引起人类肿瘤,如 Burkitts 淋巴瘤,鼻咽癌。很有可能 EB 病毒编码的 miRNAs 通过作用于相关的致癌基因而引起相关肿瘤的发生<sup>[70]</sup>。通过计算机软件预测分析发现 EB 病毒编码的 miRNAs 作用于凋亡途径和肿瘤抑制途径。病毒编码的 miRNA 在病毒所致疾病中有重要的作用,这不仅对于阐明病毒和宿主的相互作用有重要作用,而且对于设计新的干预和治理措施有重要意义。

#### 六、microRNA 与病毒性肝炎

一般来说宿主细胞的 miRNAs 抑制病毒复制或根本不允许病毒在宿主细胞内存在。近来报道肝脏特异的 miR-122 对于 HCV 在肝细胞内的复制起到明显的促进作用<sup>[86]</sup>。HCV 是嗜肝病毒,尽管 HepG2 和 Huh7 都来源于人肝癌细胞,但 HCV 构建的复制子只能在 Huh7 细胞内复制。虽然 miR-122 是肝脏特异的,但 HepG2 细胞并不表达 miR-122。为了探寻 miR-122 与 HCV 复制之间的关系,Catherine 等经过一系列系统研究发现 miR-122 与 HCV 5'-端非翻译区的互补区



相互作用并增强 HCV 的复制, miR-122 对病毒 mRNA 的翻译和稳定并无明显作用。这个出乎意料的结果表明 miRNAs 的功能远不止我们目前发现的这些。

日本学者 Murakami 等<sup>[87]</sup>研究了肝细胞癌和非肝细胞癌组织的 miRNAs 的表达谱模式。应用人 miRNAs 微点阵技术检测了 25 对肝癌组织和癌旁组织内 miRNAs 的表达谱,发现在肝癌组织有 3 个 miRNAs 高表达,5 个 miRNAs 低表达;4 个 miRNAs 的表达水平与肝细胞癌的分化程度呈反相关。并且发现慢性肝炎和肝硬化样本的 miRNAs 表达模式明显不同,然而慢性乙型肝炎和慢性丙型肝炎样本的 miRNAs 表达模式没有差别。

### 七、microRNA 在病毒性肝炎研究中的可行性和前景

microRNA 是普遍存在于真核细胞内的微小 RNA,主要作用于基因的转录后水平,调控细胞的生长、分化和死亡。目前发现 microRNA 对肿瘤的发生有很重要的作用,主要通过调节细胞的生长、分化和死亡发挥作用。研究发现不同组织来源的癌细胞系具有相似的 microRNA 表达模式,例如所有正常组织都高表达 let-7,但是所有癌细胞系 let-7 均呈低表达,研究发现 let-7 作用于癌基因 Ras<sup>[88]</sup>。肝炎病毒,尤其是乙、丙型肝炎病毒感染后易慢性化,严重可发展成肝硬化甚至肝癌,所以研究 microRNA 与慢性病毒性肝炎的关系是十分必要的,对于阐明慢性肝炎的发病机制及治疗策略将是十分有益的。另一方面目前又发现有些病毒本身亦能够编码 microRNA,可能通过作用于宿主细胞靶基因发挥作用,具体机制目前还不十分清楚。这样病毒感染宿主后一方面宿主本身 microRNA 对病毒的作用,另一方面病毒编码的 microRNA 亦可以作用于宿主基因,这样在病毒和宿主之间通过 microRNA 进行的相互调节对于病毒性疾病的发生发展应是十分重要的。目前发现的编码 microRNA 的病毒主要是疱疹病毒家族,其长期潜伏在细胞核内,而且没有因病毒大量复制而使细胞裂解;因为 Drosha 位于细胞核内,只有在核内的病毒才有可能被 Drosha 切割产生 microRNA。乙型肝炎病毒感染慢性化后乙肝病毒的复制模板 cccDNA 就位于细胞核内,而且是长期感染,不存在细胞裂解的问题,所以乙肝病毒亦很有可能通过产生病毒 microRNA 参与疾病的发生与发展。所以从 microRNAs 水平对肝炎病毒尤其是乙型和丙型肝炎病毒进行研究,对于阐明发病机制,研究新的治疗策略,预防肝癌的发生都是十分必要的。

### 参 考 文 献

- 1 Lee RC, Feinbaum RM, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75:843-854.
- 2 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-4* by *lin-14* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 75:855-862.
- 3 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403:901-906.
- 4 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Ge-*

- nome Res,2004,14:1902-1910.
- 5 Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*,2004,432: 231-235.
- 6 Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*,2004,432: 235-240.
- 7 Han J, Lee Y, Yeom KH, et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*,2004,18:3016-3027.
- 8 Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T, et al. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*,2004,14:2162-2167.
- 9 Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D, et al. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNA. *RNA*, 2004,10:185-191.
- 10 Lund E, Guttinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*,2004,303:95-98.
- 11 Yi R, Qin Y, Macara IG, et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 2003,17:3011-3016.
- 12 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*,2001,409:363-366.
- 13 Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. Elegans Dev Timing. *Cell*,2001,106:23-34.
- 14 Hutvagner G, Mclachlan J, Pasquinelli AE, et al. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*,2001,293:834-838.
- 15 Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, et al. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. *Genes Dev*,2001,15:2654-2659.
- 16 Knight SW, Bass BL. A role for RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in Caenorhabditis elegans. *Science*,2001,293:2261-2271.
- 17 Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*, 2005,19:1-15.
- 18 Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNA can function as miRNAs. *Genes Dev*, 2003,17:438-442.
- 19 Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*,2002,297:2056-2060.
- 20 Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003,100:9779-9784.
- 21 Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*,2000, 408:86-89.
- 22 Slack FJ, Basson M, Liu Z, et al. The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the lin-29 transcription factor. *Mol Cell*,2000,5:659-669.
- 23 Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*,2003,113:25-36.
- 24 Xu P, Vernooij SY, Guo M, et al. The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*,2003,3:790-795.
- 25 Teleman AA, Cohen SM. Drosophila lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes Dev*,2006,20:417-422.
- 26 Johnston RJ, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in Caenorhabditis elegans. *Nature*,2003,26:845-849.
- 27 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*,2001,5:188-200.
- 28 Aravin A, Tuschl T. Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett*,2005,79:5830-5840.
- 29 Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, et al. RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*,2004,10:1174-1177.
- 30 Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*, 2006,13:13-21.
- 31 Yang Z, Ebright YW, Yu B, et al. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*,2006,34:667-675.
- 32 Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, et al. The microRNAs of Caenorhabditis elegans. *Genes Dev*,2003,17: 991-1008.



- 33 Lim LP, Glasner ME, Yekta S, et al. Vertebrate microRNA genes. *Science*, 2003, 299: 1540.
- 34 Ohler U, Yekta S, Lim LP, et al. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA*, 2004, 10: 1309-1322.
- 35 Grad Y, Aach J, Hayes GD, et al. Computational and experimental identification of *C. elegans* microRNAs. *Mol Cell*, 2003, 11: 1253-1263.
- 36 Lai EC, Tomancak P, Williams RW, et al. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*, 2003, 4: R42.
- 37 Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005, 434: 338-345.
- 38 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, 115: 787-798.
- 39 Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004, 18: 504-511.
- 40 Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, et al. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 6284-6291.
- 41 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005, 120: 15-20.
- 42 Brennecke J, Stark A, Russell RB, et al. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 2005, 3: e85.
- 43 Farh KK, Grimson A, Jan C, et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*, 2005, 310: 1817-1821.
- 44 Stark A, Brennecke J, Bushati N, et al. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution. *Cell*, 2005, 123: 1133-1146.
- 45 Adai A, Johnson C, Mlotshwa S, et al. Computational prediction of miRNAs in *rabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 2005, 15: 78-91.
- 46 Chan CS, Elemento O, Tavazoie S. Revealing posttranscriptional regulatory elements through network-level conservation. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1: e69.
- 47 Bonnet E, Wuyts J, Rouze P, et al. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics*, 2004, 20: 2911-2917.
- 48 Washietl S, Hofacker IL, Stadler PF. Fast and reliable prediction of noncoding RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2454-2459.
- 49 Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, et al. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2005, 23: 1383-1390.
- 50 Missal K, Rose D, Stadler PF. Non-coding RNAs in *Ciona intestinalis*. *Bioinformatics*, 2005, 21 (Suppl): ii77-ii78.
- 51 Hsu PW, Huang HD, Hsu SD, et al. miRNA map: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: D135-D139.
- 52 Bentwich I, Avniel A, Karov Y, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 2005, 37: 766-770.
- 53 Sewer A, Paul N, Landgraf P, et al. Identification of clustered microRNAs using an ab initio prediction method. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 267.
- 54 Xue C, Li F, He T, et al. Classification of real and pseudo microRNA precursors using local structure-sequence features and support vector machine. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6: 310.
- 55 Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2005, 2: 269-276.
- 56 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294: 858-862.
- 57 Seitz H, Royo H, Bortolin ML, et al. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Res*, 2004, 14: 1741-1748.
- 58 Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 2697-2706.
- 59 Seitz H, Royo H, Bortolin ML, et al. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse *Dlk1-Gtl2* domain. *Genome Res*, 2004, 14: 1741-1748.
- 60 Nelson PT, Baldwin DA, Searce LM, et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods*, 2004, 1: 155-161.

- 62 Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 2005, 309: 310-311.
- 63 Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, et al. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods*, 2006, 3: 27-29.
- 64 Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, et al. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA*, 2006, 12: 187-191.
- 65 Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425: 415-419.
- 66 Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA*, 2003, 9: 112-123.
- 67 Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 2004, 10: 1957-1966.
- 68 Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA*, 2006, 12: 733-750.
- 69 Cui C, Griffiths A, Li G, et al. Prediction and identification of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs. *J Virol*, 2006, 80: 5499-5508.
- 70 Cai X, Schafer A, Lu S, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, 2006, 2: e23.
- 71 Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, et al. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol*, 2005, 79: 9556-9565.
- 72 Sano M, Kato Y, Taira K. Sequence-specific interference by small RNAs derived from adenovirus VA1 RNA. *FEBS Lett*, 2006, 580: 1553-1564.
- 73 Aparicio O, Razquin N, Zaratigui M, et al. Adenovirus virus-associated RNA is processed to functional interfering RNAs involved in virus production. *J Virol*, 2006, 80: 1376-1384.
- 74 Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethis S, et al. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 2005, 435: 682-686.
- 75 Omoto S, Ito M, Tsutsumi Y, et al. HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology*, 2004, 1: 44.
- 76 Mathews MB, Shenk T. Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol*, 1991, 65: 5657-5662.
- 77 Thimmappaya B, Weinberger C, Schneider RJ. Adenovirus VA1 RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell*, 1982, 31: 543-551.
- 78 Gwizdek C, Bertrand E, Dargemont C, et al. Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase iii transcripts to the cell cytoplasm. *J Biol Chem*, 2001, 276: 25910-25918.
- 79 Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 2004, 16: 861-865.
- 80 Ma JB, Ye K, Patel DJ. Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 2004, 429: 318-322.
- 81 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116: 281-297.
- 82 Linial ML. Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol*, 1999, 73: 1747-1755.
- 83 Bannasser Y, Le SY, Yeung ML, et al. HIV-1 encoded candidate micro-RNAs and their cellular targets. *Retrovirology*, 2004, 1: 43.
- 84 Couturier JP, Root-Bernstein RS. HIV may produce inhibitory microRNAs (miRNAs) that block production of CD28, CD4 and some interleukins. *J Theoret Biol*, 2005, 235: 169-184.
- 85 Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, et al. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*, 2006, 442: 82-85.
- 86 Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 2005, 309: 1577-1581.
- 87 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 2006, 25: 2537-2545.
- 88 Johnson S, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005, 120: 635-647.

(收稿日期: 2007-01-22)

(本文编辑: 王宇)